

06-10



Emerald Luc Vector Series

pELuc-test (Code No. ELV-101)
pELuc(PEST)-test (Code No. ELV-201)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3629

ー目次ー

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

本製品に用いられるルシフェラーゼ遺伝子並びにこれらを用いた遺伝子転写活性測定技術について、独立行政法人産業技術総合研究所及び弊社より特許出願中です。本製品の利用は研究目的に限られます。研究目的以外でのご利用は弊社までお問い合わせください。

[1] はじめに

リポーター遺伝子を用いた遺伝子発現解析は、ある遺伝子のプロモーターなどの転写制御配列をリポーター遺伝子に連結したプラスミドを細胞へ導入し、このリポーター酵素の活性を指標に遺伝子発現を評価する手法です。特にルシフェラーゼの発光を利用したシステムは感度が高く活性測定が簡便なことから、リポーターとして広く用いられています。

Emerald Luc システムは、産業技術総合研究所・近江谷先生らのグループとの共同研究によって開発された新規なルシフェラーゼ（Emerald Luc）を用いたリポーターアッセイシステムです（1，特許出願中）。Emerald Luc は、ホタル由来ルシフェラーゼと同じ D-luciferin を発光基質としておりますが、ホタルルシフェラーゼと比べ、生細胞において安定で、シグナル強度の高い発光が観察されます。

本製品は、この Emerald Luc システムのベクターシリーズです。本ベクターに転写制御配列を挿入していただくことによって、生細胞での発光イメージングや非破壊計測によるリポーターアッセイにご利用いただけます。また、本ルシフェラーゼは、細胞を溶解し発光測定を行うような破壊計測における発光安定性も高く、破壊計測用のルシフェラーゼとしても最適です（図 1）。

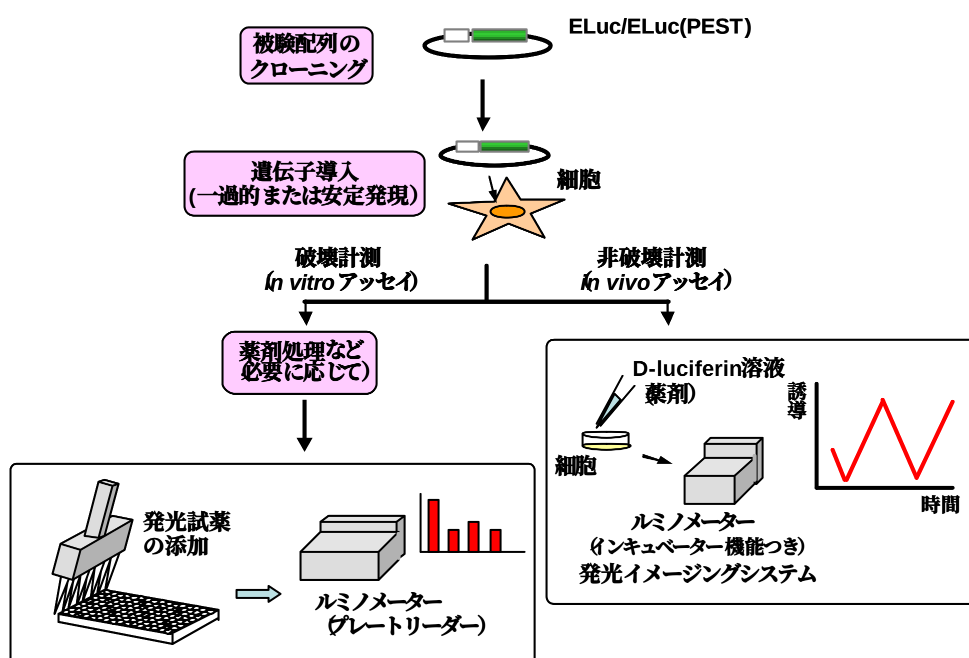


図 1. リポーターアッセイの実験フロー

本製品には以下の特長があります。

特長 1　生細胞における高い発光シグナル

ホタル由来ルシフェラーゼと比べ、生細胞において高い発光が観察されます。細胞培養液に D-luciferin を添加することによって、生細胞において発光を測定することが可能です。現在注目されている発光イメージングのプローブとして最適です。

特長 2 動的な変動解析が可能 **【Emerald Luc –Short life タイプ- (Code No. ELV-201)】**

時計遺伝子のリズム解析などの特に動的な転写変動解析には、ルシフェラーゼの C 末端に分解促進シグナル(PEST 配列)を付加した Emerald Luc –Short life タイプ- (Code No. ELV-201)が適しています。高発光検出には、スタンダードな Emerald Luc (Code No. ELV-101)をご利用ください。

特長 3 高い発光安定性

ホタル由来ルシフェラーゼと比べ、破壊系測定において高い発光安定性を示しますので、発光の減衰が少なくHTS アッセイに最適です。 ＊Emerald Luc システム専用の破壊系(*in vitro*)測定試薬は近日発売予定です。

[2] 製品内容

Emerald Luc ベクターシリーズ

品名	包装	Code No.
Emerald Luc プロモーター挿入用ベクター **pELuc-test**	10μg	ELV-101
Emerald Luc-Short life タイプ-プロモーター挿入用ベクター **pELuc(PEST)-test**	10μg	ELV-201

[3] Emerald Luc ベクターの説明

1. ルシフェラーゼ遺伝子

Emerald Luc は、ブラジル産ヒカリコメツキ *Pyrearinus termitilluminans* 由来のルシフェラーゼ遺伝子をもとに、哺乳類細胞で効率よく翻訳されるように遺伝子工学的に改変されたルシフェラーゼ遺伝子です。ホタル由来のルシフェラーゼと同じ D-luciferin を発光基質としておりますが、生細胞においてより高い発光が観察されます(図 2,3,4)。また、一般的に行われる細胞を溶解して行う検出においても優れた発光安定性を示します(図 5)。

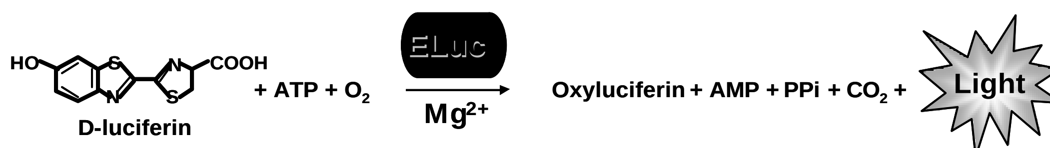
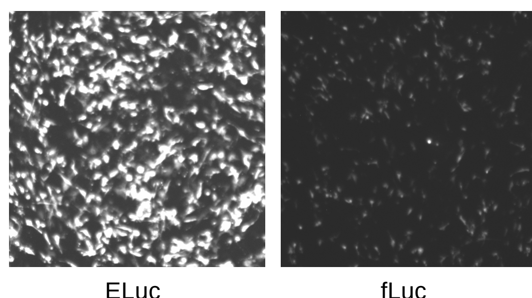


図 2. Emerald Luc による発光反応



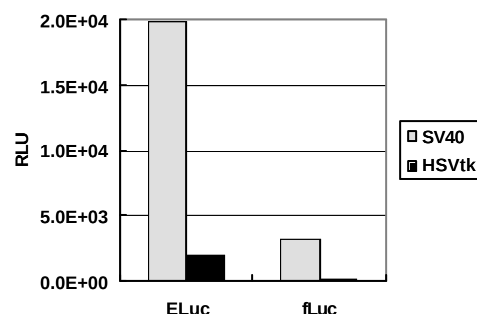


図 3. 細胞の発光像
Emerald Luc (ELuc) とホタルルシフェラーゼ(fLuc) を NIH3T3 細胞にトランスフェクションして各ルシフェラーゼを発現させ、培地に 0.2 mM D-luciferin を加え、細胞を撮影しました。

図 4. 生細胞中での発光量比較
SV40 プロモーター及び HSVtk プロモーターに Emerald Luc (ELuc)とホタルルシフェラーゼ(fLuc)に連結し、HeLa S3 細胞にトランスフェクションしました。24 時間後に培地に 0.2 mM D-luciferin を添加し、発光を測定しました。

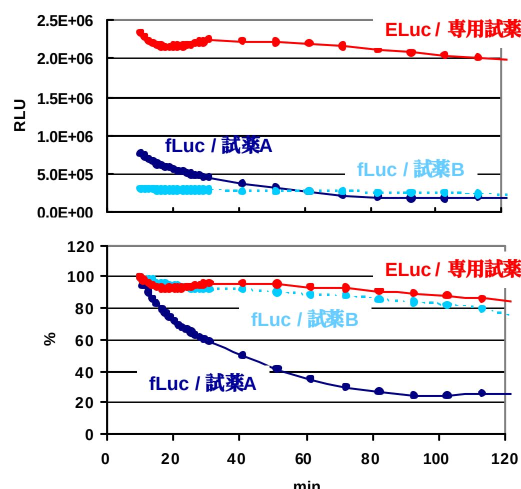


図 5. 細胞破壊検出における発光安定性
SV40 プロモーターの下流に Emerald Luc (ELuc)とホタルルシフェラーゼ(fLuc)を連結し、CHO 細胞にトランスフェクションし各ルシフェラーゼを発現させました。ELuc 導入細胞には専用の発光試薬(近日発売予定)を、fLuc 導入細胞には他社ホタルルシフェラーゼ検出用試薬 A または B を、培養液と等量添加しました。10 分間放置した後、繰り返し発光を測定し、発光の強度(推移)を調べました。上図に発光強度を、下図に相対活性(各測定で最初の計測値を 100)を示します。

Emerald Luc は、最大発光波長 538nm の緑色の発光を呈します。この発光スペクトルは pH の影響をほとんど受けません。さらに、発光検出に使用される光電子増倍管（PMT）や CCD カメラではこの領域に高い量子効率を示すものが多く、ハード面からも好適なルシフェラーゼといえます。

2. Short life タイプのルシフェラーゼ遺伝子

一般に、一度発現したルシフェラーゼなどのリポータータンパク質が細胞内に比較的長時間とどまることによってバックグラウンドとなるシグナルが生じ、遺伝子発現の変化を過小評価してしまうケースがあります。Li らは、マウス ornithine dehydrogenase 由来 PEST 配列をリポーターに付加することによって、リポータータンパク質を不安定化させることに成功しました(2)。Short life タイプベクターはこの技術を応用した高レスポンス型ルシフェラーゼベクターです。Emerald Luc の C 末端に PEST 配列を連結されているので、細胞内においてルシフェラーゼが速やかに分解されます（図 6、7）。この結果、該日時計遺伝子の転写変動など、動的な発現変動が解析しやすくなっています（図 8）。

図 6. スタンダードタイプの Emerald Luc と Short life タイプの Emerald Luc (PEST)

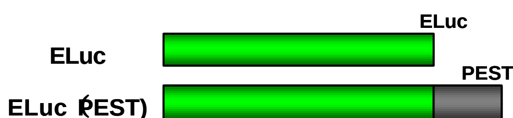


図7. Emerald Luc及び-Short lifeタイプ-の細胞内安定性
Emerald Luc(Eluc)、Emerald Luc –Short life タイプ- (ELuc(PEST))を安定発現するCHO細胞をシクロヘキシミド処理して翻訳反応を停止させました。その後、各経過時間における残存発光活性を測定し、プロットしました。●及び破線:ELuc、▲及び実線:ELuc(PEST)。この結果、Emerald Luc –Short life タイプ- (ELuc(PEST))の細胞内半減期は約3時間と見積もられました。

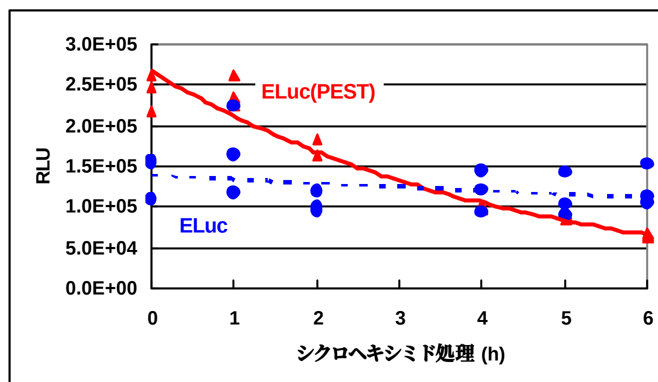
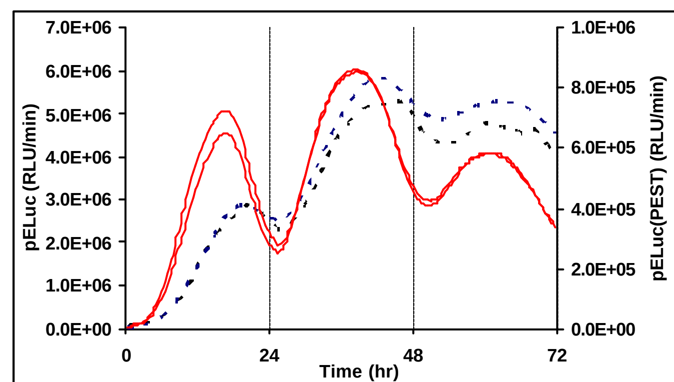


図 8. 概日時計遺伝子の転写変動解析
pELuc-test、pELuc(PEST)-test のルシフェラーゼ遺伝子上流に概日変動性の報告されている *Bmal1* 遺伝子プロモーターを挿入したプラスミドを、NIH3T3 細胞へトランスフェクションしました。その後、この細胞を 100nM デキサメタゾンで処理し、0.2mM D-luciferin を含む培地に置換し、培養しながら連続発光測定装置で 3 日間発光を測定しました。破線は ELuc、実線は ELuc(PEST)を示します。



3. ベクターの構造

Emerald Luc ベクターシリーズは、弊社 MultiReporter Assay System –Tripluc®– ベクターシリーズと同じマルチクローニングサイトを有しております。その他、Emerald Luc ベクターシリーズは以下のエレメントを有しております（ベクターマップは p. 8 に示します）。

SV40 late poly(A) signal

ポリアデニル化シグナルは RNA Polymerase II の転写終結に寄与し、転写産物の 3'末端に 200～250 bp

程度のアデノシンを付加します。これにより、RNA の安定性や翻訳効率が増大します。

Background reduction signal

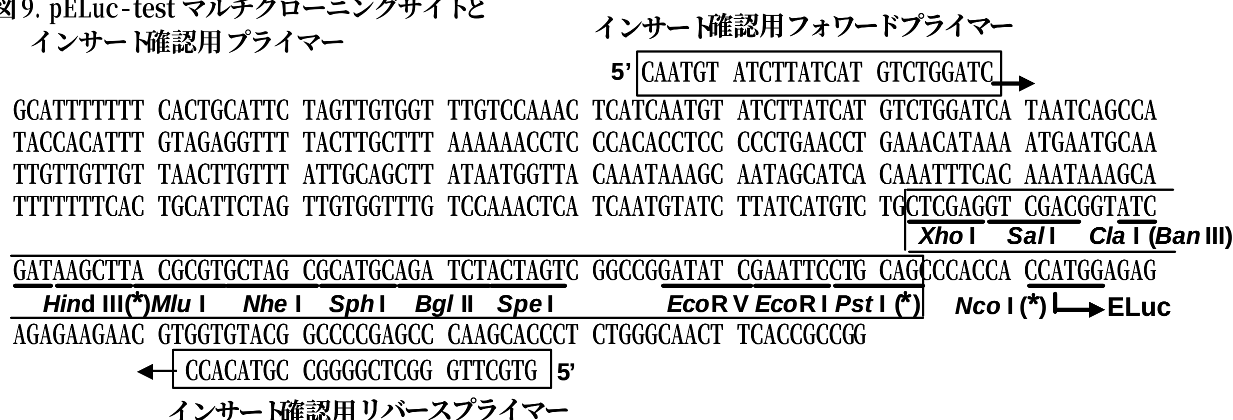
ポリアデニル化シグナルである AATAAA を 2 つ含む SV40 early poly(A) signal をタンデムにルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置し、より強力な転写終結のためのシグナルとしてベクターバックボーンに起因するノイズシグナルを低減します(3)。マルチクローニングサイトの上流にタンデムに配置されているため、インサート確認用のプライマーを設計される場合には注意が必要です。（p.7 をご参照下さい）。

[4] 哺乳類細胞におけるアッセイ方法の概略

1. 被験配列（プロモーターなど）のクローニング

pELuc-test、pELuc(PEST)-test のマルチクローニングサイトへプロモーターなどの転写制御配列をクローニングします。被験配列のクローニングには、弊社 high fidelity ホットスタートPCR 酵素 KOD –Plus–（Code No. KOD-201）や KOD –Plus– Ver.2（Code No. KOD-211）のご使用をお薦めいたします。

インサートをご確認いただくためのコロニーダイレクトPCR あるいはシーケンス反応には、下記の挿入配列確認用プライマーのご使用をお薦めいたします。



(注 1) pELuc(PEST)-test もマルチクローニングサイトは同じ塩基配列を有しておりますが、(*) 印の制限酵素はベクター内の他の部位も切断しますので、クローニング部位としてはお薦めできません。インサート確認用プライマーは同じ配列のものを使用できます。

(注 2) バックグラウンド低減シグナルとして SV40 poly(A) signal が複数配置されているため、プライマーをマルチクローニングサイトの上流近傍に設計されますと、PCR 反応やシーケンス反応を上手く行うことができません。インサート確認用フォワードプライマーとしては、「MultiReporter Assay System -Tripluc®-挿入配列確認用プライマー（フォワード、pSLG/pSLO/pSLR 共通）SLGOR-F primer」（Code No. MRV-401）をご利用いただけます。

2. リポーターアッセイ

プロモーターなどの被験配列を Emerald Luc に連結したプラスミドを哺乳類細胞へトランスフェクションします。その後、必要に応じて調べたい薬剤で細胞を処理し、Emerald Luc の活性を測定します。測定方法については下記の 2 種類の方法があります。

(1) 生細胞計測（非破壊計測、*in vivo* 計測）

細胞培養液に 0.2～1 mM D-luciferin（Code No. MRL-101, 102）を添加し、調べたい条件で細胞をインキュベートし、ルミノメーターあるいは発光イメージングシステムで検出します。生細胞でアッセイするため、時間経過による変動解析、リアルタイム解析が可能です。特に、発光イメージングシステムではシングルセルで転写変動を解析できます。

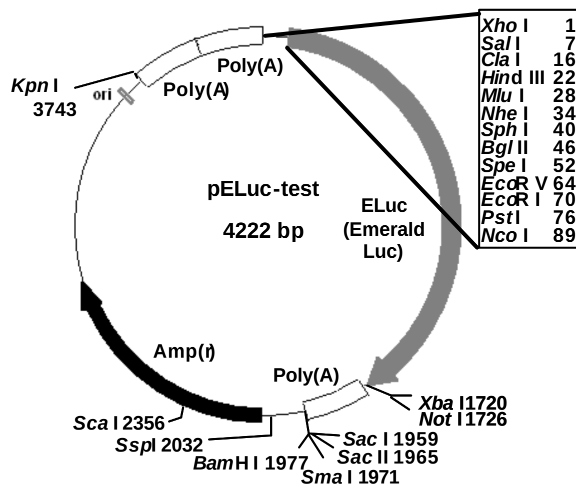
(2) 破壊計測（*in vitro* 計測） ＊専用試薬は近日発売予定です。

調べたい条件で細胞をインキュベートした後、細胞溶解・発光反応を行う試薬を添加し、発光をルミノメーターで検出します。生細胞計測に比べ、発光強度の高い測定が可能です。

[5] ベクターマップ及び配列情報

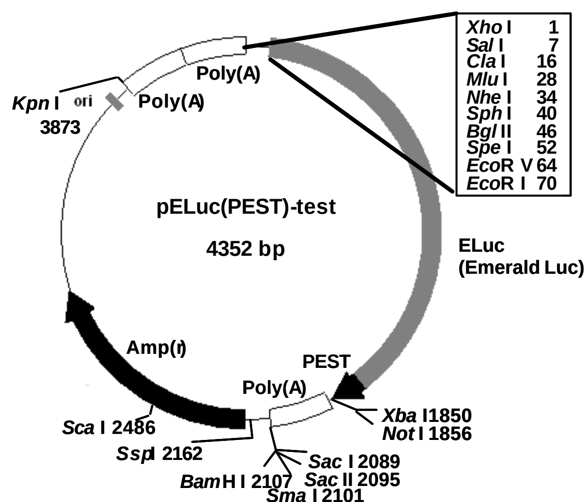
(1) pELuc -test

pELuc-test	
Multiple cloning region	1-89
Emerald Luc gene (ELuc)	91-1719
SV40 late poly(A) signal	1733-1958
β-lactamase (Amp (r)) gene	2052-2912
background reduction signal	3743-4222



(2) pELuc(PEST)-test

pELuc(PEST)-test	
Multiple cloning region	1-70
Emerald Luc gene (ELuc)	91-1716
PEST	1717-1839
SV40 late poly(A) signal	1863-2087
β-lactamase (Amp (r)) gene	2182-3042
background reduction signal	3873-4352



(注) pELuc(PEST)-test についても、制限酵素 *Hin*d III、*Pst* I、*Nco* I の認識配列が ELuc 遺伝子上流のマルチクローニングサイトに存在しますが、ベクター内の他の部位にも存在しますので、クローニング部位としてはお薦めできません。

[6] ベクター制限酵素認識部位及び塩基配列

(1) pELuc -test

表 1. pELuc ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位		酵素	箇所	切断部位
Acc I	2	7	1110	*Eco* RV	1	64		*Pvu* I	1	2467
Alw 44I	2	2167	3413	*Ehe* I	1	1546		*Sac* I	1	1959
Ase I	1	2663		*Fsp* I	1	2614		*Sac* II	1	1965
Bam HI	1	1977		*Hae* II	2	1546	3483	*Sal* I	1	7
Ban III	1	16		*Hin* 1I	2	1546	2298	*Sca* I	1	2356
Bcl I	2	932	1400	*Hind* III	1	22		*Sma* I	1	1971
Bgl I	1	2715		*Kpn* I	1	3743		*Spe* I	1	52
Bgl II	1	46		*Mlu* I	1	28		*Sph* I	1	40
Bst XI	2	83	285	*Nar* I	1	1546		*Ssp* I	1	2032
Cfr 9I	1	1971		*Nco* I	1	89		*Sty* I	1	89
Cla I	1	16		*Nhe* I	1	34		*Xba* I	1	1720
Eco 52I	2	58	1727	*Not* I	1	1726		*Xho* I	1	1
Eco 81I	2	484	1611	*PpuM* I	1	1257		*Xmn* I	1	2235
Eco RI	1	70		*Pst* I	1	76				

表2. pELuc-testベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Afl* II	*Apa* I	*Bbr* PI	*Bfr* I	*Bpu* 1102I	*Bsi* WI	*Bss* HII	*Bst* EII
*Csp*45 I	*Csp* I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco*47III	*Eco* T22I	*Mro* I	*Msc* I	*Nde* I	*Nru* I
Nsp V	*Pac* I	*Pvu* II	*San*D I	*Sfi* I	*Srf* I				

pELuc-test ベクター配列 弊社ウェブサイトからダウンロード可能です。）

1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
81 gcccaccacc atggagagag agaagaacgt ggtgtacggc cccgagccca agcaccctct gggcaacttc accgccggcg
161 agatgctgta caacgctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tgggcaacga gtccctttcc
241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaacg atgtcgtgtc
321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgcct ggtacatcgg catggtggtg gcccctgtga
401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaccgg catctccaag ccgatcctgg tcttcaccac taggaagatc
481 ctgcctaagg ttttggaggt taaagacaga accaactaca taaagaggat catcatactg gactctgaag agaacctgct
561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggtactcc gacaacaacc tccaaacatt caagcctctg cactacgacc
641 ctgtggacca ggtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg tgatgcagac ccacaggaac
721 atctgtgtga gactcacaca cgcatctgac cccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatccgtgc tggcctacct
801 gccattcttc cacgccttcg gcttcagtat caacctgggc tatttcatgg tgggcctgag agtggtgatg ctccgaaggt
881 ttaaccagga ggtgttcctg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
961 ctgtccaaga gccctctggt ggacaagtac gacctatcca ccctggcgga gctgtgctgt ggagccgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaagaggct gaacctgcca gggatacggt gtggctacgg tctaacagag tctacctccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcatc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccaggtgg gcgagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgacgac gacggctggc tgcactctgg cgacttcggc tactacgacg
1361 aggacgagta tttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatac aagggctatc aggtcgcccc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tccttcagca cccaggcatc agggacgtgg ccgtcgtggg tatccctgac atcgaggccg gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agcccggcgc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag agggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatccccagg aacgtgacag gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg ccctgatgga gaaggcttct aagctgtaat ctagagcggc cgcccagaca tgataagata cattgatgag
1761 tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac

```
1841  cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg
1921  tttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtatgga gctcccgcgg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc
2001  atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct
2081  tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc
2161  agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt
2241  tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg
2321  tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag
2401  taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg
2481  aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc
2561  cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac
2641  ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt
2721  ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga
2801  tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg
2881  agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt
2961  catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
3041  ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc
3121  aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc
3201  ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc
3281  gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact
3361  caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg
3441  acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta
3521  tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg
3601  tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc
3681  aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag
3761  ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg
3841  caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa
3921  gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca
4001  taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa
4081  ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca
4161  tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tg
```

(2) pELuc(PEST) -test

表 1. pELuc(PEST)ベクターを 1 または 2 箇所切断する制限酵素

酵素	箇所	切断部位	
Acc I	2	7	1110
Alw 44I	2	2297	3543
Ase I	1	2793	
Bam HI	1	2107	
Ban III	1	16	
Bcl I	2	932	1400
Bgl I	1	2845	
Bgl II	1	46	
Bst XI	2	83	285
Cfr 9I	1	2101	
Cla I	1	16	
Eco 52I	2	58	1857
Eco 81I	2	484	1611
Eco RI	1	70	
Eco RV	1	64	
Ehe I	1	1546	
Fsp I	1	2744	
Hae II	2	1546	3613
Hin 1I	2	1546	2428
Hind III	2	22	1711
Kpn I	1	3873	
Mlu I	1	28	
Nar I	1	1546	
Nco I	2	89	1719
Nhe I	1	34	
Not I	1	1856	
PpuM I	1	1257	
Pst I	2	76	1805
Pvu I	1	2597	
Sac I	1	2089	
Sac II	1	2095	
Sal I	1	7	
Sca I	1	2486	
Sma I	1	2101	
Spe I	1	52	
Sph I	1	40	
Ssp I	1	2162	
Sty I	2	89	1719
Xba I	1	1850	
Xho I	1	1	
Xmn I	1	2365	

表2. pELuc(PEST)-testベクター内に認識部位のない制限酵素

Aat I	*Aat* II	*Afl* II	*Apa* I	*Bbr* PI	*Bfr* I	*Bsi* WI	*Bss* HII	*Bst* EII	*Csp*45I
Csp I	*Dra* III	*Eco* 105I	*Eco*47III	*Eco* T22I	*Mro* I	*Msc* I	*Nde* I	*Nru* I	*Nsp* V
Pac I	*Pvu* II	*San*D I	*Sfi* I	*Srf* I					

pELuc(PEST)-test ベクター配列　弊社ウェブサイトからダウンロード可能です。）

```
   1 ctcgaggtcg acggtatcga taagcttacg cgtgctagcg catgcagatc tactagtcgg ccggatatcg aattcctgca
  81 gcccaccacc atggagagag agaagaacgt ggtgtacggc cccgagccca agcaccctct gggcaacttc accgccggcg
 161 agatgctgta caacgctctg cacaagcact cccacatccc ccaggccatc ctggacgtga tgggcaacga gtccctttcc
 241 taccaggagt tcttcgacac tactgtgaag ctgggccaga gcctccagaa ctgtggctac aagatgaacg atgtcgtgtc
 321 gatctgtgca gagaacaaca agagattctt catccccatc atctccgcct ggtacatcgg catggtggtg gcccctgtga
 401 acgaggacta tatcccagac gagctgtgta aagtgaccgg catctccaag ccgatcctgg tcttcaccac taggaagatc
 481 ctgcctaagg ttttggaggt taaagacaga accaactaca taaagaggat catcatactg gactctgaag agaacctgct
 561 gggctgcgag agcctgcaca acttcatgtc caggtactcc gacaacaacc tccaaacatt caagcctctg cactacgacc
 641 ctgtggacca ggtagccgcc atcctgtgct cctccggcac aaccggcctg cctaaaggcg tgatgcagac ccacaggaac
 721 atctgtgtga gactcacaca cgcatctgac cccagagtgg gtacacaact catccccggc gtatccgtgc tggcctacct
 801 gccattcttc cacgccttcg gcttcagtat caacctgggc tatttcatgg tgggcctgag agtggtgatg ctccgaaggt
 881 ttaaccagga ggtgttcctg aaggccatcc aggactacga ggtgaggagc gtgatcaacg ttccctccac aatcctgttc
 961 ctgtccaaga gccctctggt ggacaagtac gacctatcca ccctggcgga gctgtgctgt ggagccgctc ctctggcgaa
1041 ggaggtggcc gagatcgccg tgaagaggct gaacctgcca gggatacggt gtggctacgg tctaacagag tctacctccg
1121 ccaacatcca tactctgcac aacgagttca agtccggctc cctgggcaag gtgacacctt acatggccgc caagatcatc
1201 gacaggaaca ccggcgaggc cctgggtcca aaccaggtgg gcgagctgtg catctgggga cctatggtaa caaaaggcta
1281 tgtgaacaac ccacaggcta ctaaggaggc catcgacgac gacggctggc tgcactctgg cgacttcggc tactacgacg
1361 aggacgagta tttctacatc gtggaccggt acaaggagct gatcaaatac aagggctatc aggtcgcccc tgtggagctg
1441 gaggagatcc tccttcagca cccaggcatc agggacgtgg ccgtcgtggg tatccctgac atcgaggccg gcgagctgcc
1521 agccggcttc gtggtgaagc agcccggcgc ccaactcacc gctaaggagg tgtacgactt cctggcccag agggtgtctc
1601 actccaagta cctgaggggc ggcgtaaggt tcgtggactc tatccccagg aacgtgacag gcaagattag tcgaaaagag
1681 ctgagggagg ccctgatgga gaaggcttct aagcttagcc atggcttccc gccggaggtg gaggagcagg ctgctggcac
1761 gctgcccatg tcttgtgccc aggagagcgg gatggaccgt caccctgcag cctgtgcttc tgctaggatc aatgtgtaga
1841 tgccattctt ctagagcggc cgcccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga
1921 aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa
2001 caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat
2081 gtggtatgga gctcccgcgg cccgggggat cctcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa
2161 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc
2241 tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac
2321 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg
2401 ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt
2481 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca
2561 tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg
2641 ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat
2721 gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag
2801 actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct
2881 ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta
2961 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt
3041 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag
3121 atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat
3201 caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg
3281 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt
3361 cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt
3441 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc
3521 ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt
3601 gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga
3681 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc
3761 gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt
```

3841 tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcggtaccga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
3921 tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag
4001 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
4081 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt
4161 aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt
4241 ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg
4321 tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tg

[7] トラブルシューティング

(1) クローニング

現象	対応
ターゲット領域の PCR 増幅が上手くいかない	ターゲット領域に GC リッチな領域が含まれる場合、PCR 反応効率が低下することがあります。下記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。 ・PCR を2 ステップサイクルにする。 ・PCR の Denature ステップを98℃、10 秒にする。 ・5%程度の DMSO をPCR 反応液に添加する。
コロニーダイレクト PCR が上手くいかない	適切なプライマーを使用してください（p.5 参照）。 また、上記のように PCR を行うことによって改善される場合があります。

(2) トランスフェクション

現象	対応
ルシフェラーゼが発現しない、または発現が低い	・もともと発現の低いプロモーターの可能性があります。 ・トランスフェクション試薬あるいは条件が不適当な可能性があります。試薬や条件を変えて実施してください。 ・プラスミド抽出の際、大腸菌が混入した可能性があります（顕微鏡で観察すると、細胞以外に菌体が認められます）。フェノール／クロロホルム抽出を実施してください。 ・プラスミドの純度が低い可能性があります。Endotoxin の混入が少なくなるように再精製してください。

[8] 参考文献

1. **中島芳浩、近江谷克裕** ***バイオテクノロジージャーナル***, **3-4**, 230-232 (2006)
2. Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., Kain, S.R. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970-34975(1998)
3. Andrew G.B., Joanna B., Cameron S.O., and Peter N.C. *Plasmid,* **44**, 173-182(2000)

[9] 関連商品

●**クローニング**

品名	包装	Code No.
High Fidelity PCR 用酵素 **KOD –Plus–**	200 U	KOD-201
High Fidelity PCR 用酵素 **KOD –Plus– Ver.2**	200 U	KOD-211
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素 **Blend Taq®**	250 U	BTQ-101
Taq ベースのブレンド型 PCR 用酵素（Hot start 対応） **Blend Taq® –Plus–**	250 U	BTQ-201
簡単ライゲーション **Ligation high**	50 回用	LGK-101
コンピテントセル **Competent high DH5α**	0.1ml×10 本	DNA-903
PCR スクリーニング **InsertCheck –Ready–/InsertCheck –Ready– *Blue*** ＜プライマーフリー＞	100 回用	PIK-151 PIK-251
挿入配列確認用プライマー（フォワード pSLG/pSLO/pSLR 共通） **SLGOR-F primer**	200 pmoles	MRV-401

●アッセイ

in vivo アッセイ用試薬 **D-luciferin（カリウム塩）**	20 mg 100 mg	MRL-101 MRL-102

●多色レポーターアッセイ

色分離機能付チューブ測定用ルミノメーター **カラフルックアナライザー™**	1 式	CLX-101
MultiReporter Assay System -Tripluc®- プロモーター挿入用ベクター **pSLG-test**	20μg	MRV-101
MultiReporter Assay System -Tripluc®- プロモーター挿入用ベクター **pSLO-test**	20μg	MRV-102
MultiReporter Assay System -Tripluc®- プロモーター挿入用ベクター **pSLR-test**	20μg	MRV-103
MultiReporter Assay System -Tripluc®- SV40 コントロールベクター **pSLG-SV40 control**	20μg	MRV-201
MultiReporter Assay System -Tripluc®- SV40 コントロールベクター **pSLO-SV40 control**	20μg	MRV-202
MultiReporter Assay System -Tripluc®- SV40 コントロールベクター **pSLR-SV40 control**	20μg	MRV-203
MultiReporter Assay System -Tripluc®- HSVtk コントロールベクター **pSLG-HSVtk control**	20μg	MRV-301
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLO/SLR TA Cloning kit**	20 回用	MRT-101/102
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLO/SLR TA Cloning kit for KOD**	20 回用	MRT-201/202
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *In vitro* アッセイ試薬 **Detection Reagents** (Lysis Solution, Assay Reagent)	100 回用 500 回用	MRA-101 MRA-102



【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部 （大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部 （東京）
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町 17 番 9 号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 （土、日、祝を除く）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio